

Production et purification des glycosidases sécrotées par le champignon *Neocallimastix frontalis*

M. HÉBRAUD, M. FÈVRE

Laboratoire de Différenciation fongique, U.A. C.N.R.S. 1127, Bâtiment 405,
43, bd du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Summary. Secretion of β -glucosidase, β -fucosidase, β -xylosidase, CMCCase and xylanase from the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis* is induced by the presence of different substrates. The three glycosidases were purified following DEAE Bio-gel A and Ultrogel AcA 34 column chromatographies, preparative isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weights and pI values of β -glucosidase, β -fucosidase and β -xylosidase determined by gel filtration and isoelectric focusing were estimated to be 120,000, 120,000, and 180,000 daltons and pH 3,85, 3,85 and 4,35 respectively.

Plusieurs phycomycètes anaérobies ont été mis en évidence parmi la population microbienne du rumen de différents ruminants. Ces champignons colonisent les fragments de plantes contenus dans le rumen et participent à l'hydrolyse de leurs parois cellulaires (1). Des études ont montré qu'ils possédaient un important équipement enzymatique (2, 3) dont les caractéristiques physico-chimiques (4) et les conditions de production (5) ont été déterminées. Trois glycosidases de la souche *Neocallimastix frontalis* isolée et identifiée par G. Fonty, du laboratoire de microbiologie à l'I.N.R.A. de Theix ont été purifiées. Ces enzymes sont importantes puisqu'elles produisent les sucres simples directement assimilables par le champignon.

Matériel et méthodes. La sécrétion des enzymes lytiques par *N. frontalis* a été suivie en cultivant le champignon à 39 °C sur un milieu semi-synthétique (6) contenant différents substrats (xylose, cellobiose, lactose, α -sophorose, Avicel, méthyl-D-glucoside), inducteurs de polyosidases chez les champignons aérobies. L'activité des β -glucosidase, β -fucosidase, β -xylosidase, CMCCase et xylanase a été mesurée en utilisant comme substrats les dérivés para-nitrophényles du β -glucose, β -fucose, β -xylose et le xylane et la CMC respectivement (5). La production des glycosidases a été faite à partir de cultures sur milieu semi-synthétique contenant 0,5 % de cellulose Avicel.

La purification d'enzymes a été réalisée par chromatographie d'échange d'ions (DEAE Bio-gel A), filtration sur ultrogel AcA 34, puis focalisation isoelectrique préparative en gel Sephadex avec des servalyt de pH 3 à 6.

Résultats et discussion. Des substrats tels que le cellobiose, l' α -sophorose et le méthyl-D-glucoside, inducteurs spécifiques de la β -glucosidase, ou la cellulose Avicel, inducteur spécifique des cellulases chez les champignons aérobies, ont

permis une bonne production d'enzymes, mais à chaque fois, l'équipement enzymatique complet de *N. frontalis* a été induit. Avec l'Avicel par exemple, qui est l'inducteur le plus efficace, la production de β -glucosidase après 5 jours de culture est 20 fois supérieure à celle obtenue avec le milieu répresseur à base de xylose 2 % ; ce rapport est de 70 pour la β -fucosidase, 7 pour la β -xylosidase, 10 pour la CMCase et 25 pour la xylanase.

La purification des enzymes de *N. frontalis* a été réalisée à partir de milieux de culture de 5-6 jours, dialysés puis lyophilisés. Les lyophilisats ont été repris dans un tampon citrate-phosphate 10 mM pH 6 puis précipités au sulfate d'ammonium. La fraction correspondant à 40-85 % de saturation permet d'éliminer 40 à 60 % des protéines et de récupérer 85 à 100 % de l'activité enzymatique totale. Après dialyse, l'échantillon a été déposé sur une colonne échangeuse d'ions DEAE Bio-gel A équilibrée avec du tampon citrate-phosphate 10 mM pH 6. Après lavage de la colonne, les protéines adsorbées ont été éluées dans un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM). La β -xylosidase a été élue à 80 mM de NaCl alors que la β -glucosidase et la β -fucosidase ont été récupérées à la même concentration saline (165 mM). Après concentration, les fractions correspondant aux deux pics d'activité ont été déposées séparément sur des colonnes ultrogel AcA 34 éluées par un tampon citrate-phosphate 10 mM pH 6 avec NaCl 50 mM.

Les poids moléculaires des enzymes natives ont pu être déterminés et sont d'environ 180 000 d pour la β -xylosidase et d'environ 120 000 d pour la β -glucosidase et la β -fucosidase qui sont de nouveau éluées simultanément.

L'IEF préparative a permis d'obtenir les enzymes purifiés et de déterminer leur point isoélectrique qui sont de 4,35 pour la β -xylosidase et de 3,85 pour la β -glucosidase et la β -fucosidase. L'électrophorèse en SDS-PAGE de ces enzymes a permis de révéler des sous-unités de 92 000 d pour la β -xylosidase et de 94 000, 80 000 et 36 000 d pour la β -fucosidase et la β -glucosidase.

L'activité des β -fucosidase et β -glucosidase est inhibée dans les mêmes proportions par le gluconolactone confirmant que ces deux activités enzymatiques sont portées par la même protéine.

Conclusion. Nous reportons ici la première purification des exoglucanases β -glucosidase, β -fucosidase et β -xylosidase d'un champignon anaérobie du rumen. Ces enzymes ont un rôle très important en libérant des sucres simples fermentescibles par les microorganismes. L'obtention d'enzymes purs permettra l'étude des paramètres de ces protéines mais aussi la production d'anticorps pour déterminer les processus de sécrétion de ces enzymes par le champignon lors de la dégradation de substrats lignocellulosiques dans le rumen.

Remerciements. — Ce travail est réalisé en collaboration avec le laboratoire de microbiologie (Gouet P. directeur) de l'I.N.R.A. de Theix et bénéficie du financement de l'ATP rumen.

- (1) Bauchop T., 1979. *Appl. environ. Microbiol.*, **38**, 148-158.
- (2) Williams A. G., Orpin C. G., 1987. *Can. J. Microbiol.*, **33**, 418-426.
- (3) Williams A. G., Orpin C. G., 1987. *Can. J. Microbiol.*, **33**, 427-434.
- (4) Hebraud M., Fèvre M., 1988. *J. gen. Microbiol.*, **134**, 1123-1129.
- (5) Hebraud M., Fèvre M., 1988. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **28**, 131-132.
- (6) Lowe S. E., Theodorou M. K., Trinci A. P. J., Hespell R. B., 1985. *J. gen. Microbiol.*, **131**, 2225-2229.